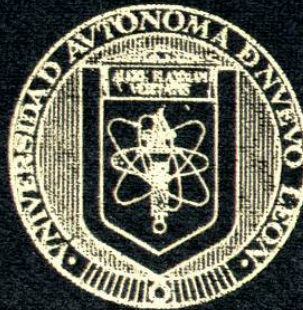


**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE MEDICINA**



**PARTICIPACION DEL FACTOR TRANSCRIPCIONAL  
SP1 EN LA REGULACION DE LA EXPRESION  
DEL GEN hPL-4.**

**Por**

**MARIA DEL CARMEN BARBOZA CERDA**

**Como requisito parcial para obtener el Grado de  
MAESTRIA EN CIENCIAS  
con Especialidad en Biología Molecular e Ingeniería Genética**

**JUNIO 1998**



TM

QH442

B3

c.1



1080080861

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA

FACULTAD DE MEDICINA

MT  
DN  
88



PARTICIPACION DEL FACTOR TRANSCRIPCIONAL  
PARTICSP1 EN LA REGULACION DE LA EXPRESION L SP1 EN  
DEL GEN hPL-4  
LA REGULACION DE LA EXPRESION DEL GEN hPL-4.

Por

Por

MARIA DEL CARMEN BARBOZA CERDA  
MARIA DEL CARMEN BARBOZA CERDA

Como requisito parcial para obtener el Grado de  
MAESTRIA EN CIENCIAS

con Especialidad en Biología Molecular e Ingeniería Genética

Como requisito parcial para obtener el Grado de  
MAESTRIA EN CIENCIAS

con Especialidad en Biología Molecular e Ingeniería Genética

Junio, 1998

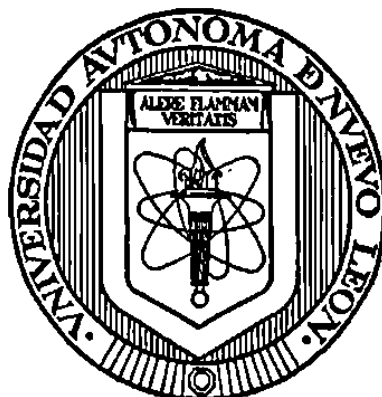
JUNIO 1998

TM  
QH 442  
B 3

B

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON**

**FACULTAD DE MEDICINA**



**PARTICIPACIÓN DEL FACTOR TRANSCRIPCIONAL SP1 EN  
LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN hPL-4.**

**Por**

**MARIA DEL CARMEN BARBOZA CERDA**

**Como requisito parcial para obtener el Grado de  
MAESTRIA EN CIENCIAS  
con Especialidad en Biología Molecular e Ingeniería Genética**

**Junio, 1998**

UNIVERSITAS RADJAWANENGAL  
FONDOS TESIS  
80861

UNIVERSITAS RADJAWANENGAL  
FONDOS TESIS MAESTRIA

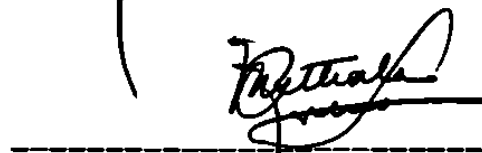
**PARTICIPACIÓN DEL FACTOR TRANSCRIPCIONAL SP1 EN LA  
REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN hPL-4.**

**Aprobación de la Tesis:**

  
-----  
**Dra. Agnès Revol de Mendoza**  
Asesor  
Secretario

  
-----  
**Dr. Hugo Barrera Saldaña**  
Co-Asesor  
Primer Vocal

  
-----  
**Dra. Martha Guerrero de Viader**  
Presidente

  
-----  
**Dra. Mirthala Moreno Sepúlveda**  
Segundo Vocal

-----  
**Dr. Manuel Villa**  
Tercer Vocal

  
-----  
**Dr. Roberto Mercado Longoria**  
Subdirector de Estudios de Postgrado



**La presente tesis se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular de la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas (ULIEG) del Departamento de Bioquímica, bajo la asesoría de la Dra. Agnès Revol de Mendoza y la co-asesoría del Dr. Hugo A. Barrera Saldaña.**

*Toda persona debe decidir,  
una vez en su vida,  
si se lanza a triunfar  
arriesgándolo todo,  
o se sienta en su balcón  
tranquilamente a  
contemplar el desfile  
de los triunfadores.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el otorgamiento de la beca que me permitió realizar mis estudios de posgrado.

Al Dr. Hugo A. Barrera Saldaña no solamente por permitirme formar parte de la ULIEG, sino por las enseñanzas, sugerencias y comentarios que fueron factores clave para la realización de esta tesis.

Mi infinito agradecimiento a la Dra. Agnès Revol de Mendoza, por aceptar ser mi asesora, por el apoyo incondicional que me brindo durante el trabajo experimental, por los momentos difíciles en los cuales me ayudo a salir adelante, por su comprensión, amistad y sobre todo por su paciencia.....GRACIAS.

Al resto de la comisión de tesis, Dra. Martha Guerrero, Dra. Mirthala Moreno y Dr. Manuel Villa, por sus acertados comentarios y por su interés en la revisión de este trabajo.

A la Dra. Herminia G. Martínez Rodríguez por permitirme realizar los ensayos de transfección en su laboratorio de cultivo celular, por sus sugerencias, comentarios y disposición en muchas ocasiones.

A la MC. Norma E. Guerra por la gran ayuda incondicional que me brindo durante los ensayos de transfección. Al MC. Martín Canizales por enseñarme la técnica de lipofección.

Al Dr. Manuel Villa por haber donado amablemente la cepa bacteriana de *E. coli* BMH 71-18 *mutS*, para los ensayos de mutagénesis.

A la MC. Ana Ma. Sifuentes y a la MC. Irma A. Martínez por su cooperación en la secuenciación de los plásmidos mutantes.

Al Dr. José Ma. Viader por sus comentarios, sugerencias e interés altruista en este trabajo.

A mi familia del laboratorio de Biología Molecular: Lolita, Ana, Irma, Claudio, Victor, Zavala, Norma O., no solo por su amistad, sino por todo el apoyo que me brindaron desde mi llegada y por compartir una parte de nuestras vidas.

A mi gran familia ULIEG: Normita, Martín, Rosi R., Alma R., Mario A., Carmen V., Ana L., Marta, Gil, Eddie, Luis, Celia, Raquel, Paty, Ale, Vicky, don Aarón, don Pedrito, don Pancho, don Raúl y don Ponchito.....MIL GRACIAS.

Agradezco especialmente a las siguientes personas que de manera desinteresada me otorgaron las facilidades necesarias para concluir mi tesis: Dra. Linda E. Muñoz Espinosa, Dr. Mario C. Salinas Carmona y Dr. Vicente Madrid Marina.

## DEDICATORIA

*A Dios;*

*"Yo soy el alpha y la omega, dice el Señor, el Dios Todopoderoso, el que es y era y a de venir.....".*

*Ap. 1:8.*

*A mis Padres;*

*Por haberme dado la vida, por ser un ejemplo de trabajo, por todo su amor, comprensión y apoyo.....ayer, hoy y siempre.*

*A mis hermanos,;*

*Sergio, César y Angie por soportarme.....los quiero mucho.*

*A toda mi familia;*

*Abuelitos, tíos, tías, primos y a la nueva generación de pequeñitos.....por todo su cariño.*

*A mi nueva familia Déctor;*

*Por todo su cariño y por hacerme sentir un miembro más de la familia.*

*A mis grandes amigas;*

*Cecilia, Walquiria y Cristina por compartir nuestros sueños....*

*A mi gran amigo;*

*Ramiro por todo el apoyo que me ha brindado através de la distancia.....*

*Especialmente, a mis dos amores;*

*A mi querido esposo Miguel Angel y mi hermoso bebe Mikel Axel por todo el amor, comprensión y apoyo.....son mi razón de vivir.....  
los amo.*

## RESUMEN

**María del Carmen Barboza Cerda** Fecha de Graduación: Junio de 1998.

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**Título del Estudio:** PARTICIPACIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN SP1 EN LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN hPL-4.

**Número de Páginas:** 60 Candidato para el Grado de Maestría en Ciencias con Especialidad en Biología Molecular e Ingeniería Genética

**Area de Estudio:** Ciencias Básicas.

**Propósito y Método del Estudio.** La hormona lactogénica placentaria (HPL) también llamada somatomamotropina coriónica (HCS), es miembro de una familia de proteínas que incluye a la hormona del crecimiento humano (HGH). Aunque HPL y HGH son altamente similares a nivel de secuencia nucleotídica (>93.5%) y aminoacídica (85%), lo que sugiere que derivan de un antecesor común, difieren completamente en sus funciones fisiológicas y en la regulación de su expresión. Se han identificado los factores transcripcionales que participan en la regulación del gen hGH-N, sin embargo, poco se conoce acerca de la regulación de los hPL's. El factor transcripcional Sp1, tiene un sitio de unión en la región promotora de todos los genes del complejo hGH-hPL y se ha sugerido que podría participar en la regulación transcripcional de los hPLs. En este trabajo, nos propusimos evaluar la participación de Sp1 en la transcripción de hPL-4 en un sistema de cultivo celular derivado de placenta. Para esto, se construyeron dos plásmidos recombinantes, los cuales poseen 500pb del promotor de hPL4 acoplados al DNac de la HGH de 20KDa como gen reportero. Uno de los plásmidos posee el sitio de unión de Sp1 intacto, mientras que en el otro se cambió por mutagénesis sitio dirigida la secuencia de unión de Sp1 de GGGAGG a GGAAAG, sobre la cual el factor transcripcional Sp1 no se puede unir. Los ensayos de transfección se realizaron en una línea celular derivada de coriocarcinoma humano (JEG-3), por medio de lipofección. Como testigo, se cotransfectó el plásmido pAVE-HGH22K que posee el cDNA de la HGH de 22KDa bajo el control de un promotor viral. La evaluación de los niveles de transcripción se realizó por RT-PCR a partir del RNA extraído de las células transfectadas.

**Contribuciones y Conclusiones.** Una vez construido el vector de expresión con el promotor de hPL4 acoplado al DNac de la HGH 20K, este sirvió de molde para obtener por mutagénesis sitio dirigida una versión mutada específicamente en el sitio de unión de Sp1. Ensayos de unión DNA-proteína confirmaron que la proteína no se podía unir al promotor mutado. En los ensayos de transfección, la co-transfección con el vector control de expresión pAVE-HGH22K, permitió comparar el potencial transcripcional de las versiones mutada y silvestre del promotor de hPL-4. Al impedir la unión de Sp1 a este promotor, disminuyó en un 50% la expresión del gen reportero en la línea JEG-3 derivada de placenta. Estos resultados corroboran la importancia del papel de Sp1 en la regulación de hPL-4 en la placenta.

FIRMA



---

**DRA. AGNÈS REVOL DE MENDOZA**  
Asesor



# TABLA DE CONTENIDO

	<b>Página</b>
<b>1. INTRODUCCION</b>	
1.1. Regulación de la iniciación de la transcripción.	1
1.2. Modulación de la transcripción.	3
1.3. El complejo multigénico hGH-hPL.	3
1.4. Estructura y función de HPL.	5
1.5. Expresión tejido-específica de los genes hPL.	6
1.6. Regulación génica.	7
1.7. El factor transcripcional Sp1.	10
1.8. Justificación.	12
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>13</b>
<b>3. MATERIAL Y METODOS</b>	<b>14</b>
3.1. Origen de los reactivos.	14
3.2. Material biológico.	15
3.3. Equipo.	16
3.4. Estrategia general.	17
3.5. Construcción de pAVE-HGH20K/P <sub>500</sub> hPL4.	18
3.5.1. Selección del vector de expresión.	18
3.5.2. Origen de las 500 pb del promotor del gen hPL4.	18
3.5.3. Obtención del plásmido intermediario.	20
3.5.4. Obtención de la construcción final pAVE-HGH20K/P <sub>500</sub> hPL4.	22
3.5.4.1 Eliminación del promotor de CMV	22
3.5.4.2 Caracterización de las clonas.	23
3.6. Purificación del vector a gran escala.	24
3.6.1. Preparación del lisado crudo.	24
3.6.2. Gradiente de CsCl/Bromuro de etidio.	25
3.7. Obtención del vector de expresión mutado en el sitio de unión a Sp1.	26
3.7.1. Mutagénesis sitio dirigida.	26

3.7.2.	Preparación de células BMH 71-18 <i>mutS</i> competentes.	29
3.7.3.	Transformación en células BMH 71-18 <i>mutS</i> .	29
3.8.	Secuenciación.	30
3.9.	Ensayos de unión DNA-proteína.	30
3.10	Experimentos de transfección en JEG-3.	34
3.10.1	Condiciones del cultivo celular.	34
3.10.2	Transfección mediante lipofección.	35
3.11	Extracción de RNA total.	36
3.12	Transcripción reversa.	37
3.13	Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)	38
3.13.1	Determinación de las condiciones del PCR.	38
3.13.2	Amplificación de los cDNAs obtenidos de las transfecciones en células JEG-3.	40
3.13.3	Análisis densitométrico y estadístico.	41
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>42</b>
4.1.	Construcción del vector de expresión pAVE-HGH20K/P <sub>500</sub> -hPL4.	42
4.1.1.	Inserción del promotor de hPL-4.	42
4.1.2.	Eliminación del promotor de CMV.	42
4.2.	Mutagénesis sitio dirigida.	43
4.3.	Caracterización de los vectores pAVE-HGH20K/P <sub>500</sub> -hPL4 silvestre y mutante.	44
4.3.1.	Caracterización enzimática.	44
4.3.2.	Caracterización por secuenciación.	45
4.4.	Efectos de la mutación.	46
4.5.	Comparación del potencial transcripcional de los promotores silvestres y mutantes.	48
4.5.1.	PCR competitivo.	48
4.5.2.	Amplificaciones de los DNAs complementarios de las células JEG-3 co-transfectadas.	49
<b>5.</b>	<b>DISCUSION</b>	<b>52</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>55</b>
<b>7.</b>	<b>REFERENCIAS</b>	<b>56</b>

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Página</b>
I.- Digestión preparativa de los plásmidos pAVE-HGH20K y pP <sub>500</sub> -hPL4.	21
II.- Condiciones de ligación.	21
III.- Digestión de las subclonas con <i>EcoR</i> I	22
IV.- Digestión de la subclona pAVE-HGH20K/P <sub>500</sub> hPL4/CMV con <i>Hind</i> III y <i>Afl</i> III.	23
V.- Polimerización del fragmento de 3686 pb.	23
VI.- Reacción de mutagénesis sitio dirigida.	28
VII.- PCR para la obtención de la sonda para los ensayos de retardación en gel.	32
VIII.- Preparación del coctel para cada una de las sondas.	33
IX.- Condiciones de incubación de cada una de las sondas con la proteína Sp1.	33
X.- Condiciones de reacción para la retrotranscripción.	38
XI.- Condiciones de la PCR	39

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
1 . Esquema del aparato de transcripción.	2
2. El complejo hGH-hPL.	4
3. Regulación transcripcional del gen hGH-N.	8
4. Estudio de la regulación transcripcional de los genes hPLs.	9
5. El factor transcripcional Sp1.	11
6. Estrategia general.	18
7. Esquema del plásmido pAVE-HGH20K.	19
8. Esquema del plásmido pP <sub>500</sub> -hPL4.	20
9. Secuencia del oligonucleótido mutagénico.	26
10. Estrategia de mutagénesis sitio dirigida.	27
11. Obtención de la sonda por PCR.	31
12. Diferenciación de los plásmidos mutante y silvestre por digestión con <i>Mnl</i> I	43
13. Caracterización enzimática de pAVE-HGH20K/P <sub>500</sub> hPL4 (WT y Mut).	45
14. Secuenciación de los promotores silvestre y mutante.	46
15. Obtención de la sonda para los ensayos de unión DNA-proteína.	47
16. Ensayos de retardación en gel.	48
17. Curva de calibración mediante PCR competitivo.	49
18. RT-PCR de las células JEG-3 transfectadas con los plásmidos recombinantes.	50
19. Análisis de los ensayos de expresión transitoria en células JEG-3.	51



## NOMENCLATURA

<b>A</b>	Nucleótido de adenina
<b>aa</b>	Aminoácidos
<b><i>Afl</i> III</b>	Endonucleasa de restricción derivada de <i>Anabaena flos-aquae</i>
<b><i>Bam</i>H I</b>	Endonucleasa de restricción derivada de <i>Bacillus amylolicuefaciens</i>
<b>°C</b>	Grados Celsius
<b>C</b>	Nucleótido de citosina
<b>CAT</b>	Cloranfenicol-acetil-transferasa
<b>CMV</b>	Citomegalovirus humano
<b>DNA</b>	Acido desoxiribonucleico
<b>cDNA</b>	Acido desoxiribonucleico complementario
<b>dNTP</b>	Cualquier desoxinucleósido trifosfato
<b>DEPC</b>	Dietilpirocarbonato
<b><i>Dpn</i> I</b>	Endonucleasa de restricción derivada de <i>Diplococcus pneumoniae</i>
<b>EDTA</b>	Acido etilendiaminotetra-acético
<b><i>Eco</i>R I</b>	Endonucleasa de restricción derivada de <i>Escherichia coli</i>
<b><i>Eco</i>R V</b>	Endonucleasa de restricción derivada de <i>Escherichia coli</i>
<b>G</b>	Nucleotido de guanina
<b>GHF-1/Pit-1</b>	Factor de hormona del crecimiento 1
<b>h</b>	Horas
<b>hGH-N</b>	Gen normal de Hormona del crecimiento humano
<b>hGH-V</b>	Gen variante de Hormona del crecimiento humano
<b>HGH</b>	Hormona del crecimiento humano
<b><i>Hind</i> III</b>	Endonucleasa de restricción derivada de <i>Haemophilus influenzae</i>
<b>HPL</b>	Lactógeno Placentario

<b>hPL-1</b>	Gen 1 de HPL
<b>hPL-3</b>	Gen 3 de HPL
<b>hPL-4</b>	Gen 4 de HPL
<b>Kb</b>	Kilopares de bases o miles de pares de bases en el DNA
<b>KDa</b>	Kilo Daltones
<b>l</b>	litros
<b>LB</b>	Medio Luria-Bertani
<b>M</b>	Concentración molar
<b>mg</b>	Miligramos
<b>µg</b>	Microgramos
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Cloruro de magnesio
<b>min</b>	Minutos
<b>ml</b>	Mililitros
<b>µl</b>	Microlitros
<b>µM</b>	Micromolar
<b>mM</b>	Milimolar
<b>M-MLV RT</b>	Transcriptasa reversa del Virus de la Leucemia Murina de Maloney
<b><i>Mnl</i> I</b>	Endonucleasa de restricción derivada de <i>Moraxella nonliquefaciens</i>
<b>ng</b>	Nanogramos
<b>nm</b>	Nanómetros
<b><i>Nsi</i> I</b>	Endonucleasa de restricción derivada de <i>Neisseria sicca</i>
<b>PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>pH</b>	Logaritmo negativo de la concentración de H <sup>+</sup>
<b><i>Pst</i> I</b>	Endonucleasa de restricción derivada de <i>Providencia stuartii</i>
<b>RNasaH</b>	Actividad que degrada RNA en híbridos DNA-RNA
<b>r.p.m.</b>	Revoluciones por minuto
<b>T</b>	Nucleótido de timidina
<b>U</b>	Unidades enzimáticas

<b>V</b>	<b>Voltios</b>
<b>5'</b>	<b>Extremo del DNA con el grupo hidroxilo en posición 5 del azucar</b>
<b>3'</b>	<b>Extremo del DNA con el grupo hidroxilo en posición 3 del azucar</b>